

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-303997

(43)公開日 平成6年(1994)11月1日

(51)Int.Cl.	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		Z 7823-4B		
C 1 2 N 15/10	ZNA	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全 11 頁)

(21)出願番号 特願平5-112515

(22)出願日 平成5年(1993)4月18日

(71)出願人 000004228

日本電信電話株式会社

東京都千代田区内幸町一丁目1番6号

(72)発明者 高木 茂

東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日

本電信電話株式会社内

(72)発明者 上岡 祐之

東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日

本電信電話株式会社内

(74)代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

(54)【発明の名称】 cDNAの分析方法

(57)【要約】

【目的】 塩基配列を求める前に、cDNAをその種類毎に分類し2次的に分離するcDNAの分析方法を提供する。

【構成】 mRNAの集合と標識をした、複数種類の逆転写プライマーを用い、各逆転写プライマー毎に、mRNAの集合を鋳型として二本鎖cDNAの集合を作成する第1の工程と、得られた二本鎖cDNAの集合毎に制限酵素で消化する第2の工程と、消化されたcDNAの集合を単位に個別のレーンで電気泳動をする第3の工程の各工程を少なくとも含むcDNAの分析方法。該cDNAの分析方法を適用し、電気泳動による2種類以上の分析パターンを得た後、1つの分析パターンのみに存在するcDNAを選択回収するcDNAの分析方法。

【効果】 遺伝子発現の解析を容易、迅速かつ完全化する方法を提供する。

特開平6-303997

(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 mRNAの集合と標識をした、複数種類の逆転写プライマーを用い、各逆転写プライマー毎に、mRNAの集合を鋳型として二本鎖cDNAの集合を作成する第1の工程と、得られた二本鎖cDNAの集合毎に制限酵素で消化する第2の工程と、消化されたcDNAの集合を単位に個別のレーンで電気泳動をする第3の工程の各工程を少なくとも含むことを特徴とするcDNAの分析方法。

【請求項2】 逆転写プライマーの標識として、ラジオアイソトープ、蛍光色素、ビオチンの少なくともいずれか1つ以上を用いることを特徴とする請求項1に記載のcDNAの分析方法。

【請求項3】 逆転写プライマーとしてオリゴdTの3'末端にアデニン、グアニン、シトシンのいずれかで始まる、2〜4塩基長のデオキシヌクレオチドを結合した逆転写プライマーを使用することを特徴とする請求項1又は2に記載のcDNAの分析方法。

【請求項4】 2種類以上のmRNAの集合の分析に請求項1〜3に記載のcDNA分析方法を適用し、電気泳動による2種類以上の分析パターンを得た後、1つの分析パターンのみに存在するcDNAを選択回収することを特徴とするcDNAの分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は多種類あるcDNAを分類し、2次的に分離する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 DNAに書かれた遺伝情報がmRNAに転写され、リボソームがこのmRNA上の遺伝暗号を解釈しながら、アミノ酸をつなぎ蛋白質を合成する。生体の各細胞に数千〜数万種類のmRNAが含まれている。これらmRNA全体についての情報を得ることは、医学、薬学、水産学、農学分野での基本的課題の一つである。しかし、通常はmRNAの配列を直接決定することは行わず、mRNAを鋳型にして合成したcDNAを基に分析を行う。このため、従来は(1)オリゴdTのプライマーをmRNAのポリA末端部にアニーリングし、(2)このプライマーから、mRNAを鋳型として、それに相補するDNAを逆転写酵素により合成し、(3)更にもう片方のDNAをDNAポリメラーゼにより合成して二本鎖cDNAを作成し、(4)この二本鎖cDNAをベクターに接続し、(5)このベクターを直接あるいはファージ粒子にパッケージングした後バクテリアに導入して、バクテリアのコロニーあるいはプラークとして分離、増幅後、回収し、(6)回収したcDNAの塩基配列を次々求める、という工程をとっていた。cDNAの分離は工程(5)で行われていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上述のようなcDNA

2

の分離工程(5)では、分離して得た2つの物が同一種類の物か、あるいは、異なる種類の物か不明である。更にこの分離工程(5)では、全体の物が何種類に分れてきているか不明である。すなわち分離工程(5)では分離はなされていなかった。このため塩基配列を求める工程(6)では、同一種類のmRNAに由来するcDNAの塩基配列を何回も求めてしまい無駄な労力を費やしてしまうという問題がある。また、塩基配列を求める工程(6)では、すべての種類のmRNAのうち、既にどれだけの物の塩基配列が求まり、どれだけの物が塩基配列を決定されずに残されているか不明であるため、どこで工程(6)を終了すればよいかの判断がつけられないという問題がある。更に、mRNAの量は種類によって、数百〜数千倍も異なっているため、従来法では、量の多いものから先に取り出され、量の少ないものは取りこぼしやすいという問題がある。また、2つのcDNAの集合があり、含まれているcDNAの種類の差を求めたい。例えば、遺伝病にかかった細胞と正常な細胞の遺伝的差異、あるいは、2つの品種の遺伝的差異を分析したい場合、従来法では困難であった。本発明の目的は、塩基配列を求める前に、cDNAを選択的に分離するcDNAの分析方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はcDNAの分析方法に関する発明であって、mRNAの集合と標識をした、複数種類の逆転写プライマーを用い、各逆転写プライマー毎に、mRNAの集合を鋳型として二本鎖cDNAの集合を作成する第1の工程と、得られた二本鎖cDNAの集合毎に制限酵素で消化する第2の工程と、消化されたcDNAの集合を単位に個別のレーンで電気泳動をする第3の工程の各工程を少なくとも含むことを特徴とする。そして、本発明の第2の発明は他のcDNAの分析方法に関する発明であって、2種類以上のmRNAの集合の分析に第1の発明のcDNA分析方法を適用し、電気泳動による2種類以上の分析パターンを得た後、1つの分析パターンのみに存在するcDNAを選択回収することを特徴とする。

【0005】 本発明は、前記の問題点を解決するため、塩基配列を求める前に、cDNAをその種類毎に分類し2次的に分離するcDNAの分析方法を提供するものである。

【0006】 m種類の逆転写プライマーを用い、mRNAの集合を鋳型として二本鎖cDNAの集合を作成する第1の工程により、まずcDNAがm種類の集合に分類される。次に各種類のcDNAの集合毎に制限酵素で消化する第2の工程により、cDNAが長さに関して平均n通りに分類され、従って、合計mn通りに分類される。消化されたcDNAの集合を単位に個別のレーンにのせることにより、まずm通りに分離され、電気泳動に

(3)

特開平6-303997

3

より、各レーン毎にcDNAが長さ方向にn通りに分離される。すなわち、工程1と工程2により、mn通りに分類されたものが工程3によりmn通りに分離される。同一逆転写プライマー、同一制限酵素、同一電気泳動条件を用いれば、同一種類のcDNAは電気泳動のゲル上の同一位置に、異なった種類のcDNAは電気泳動のゲル上の異なった位置に再現性よく配置される。mRNAの2つの集合A、Bに対し、同一逆転写プライマー、同一制限酵素、同一電気泳動条件を用いて、前記第1工程、第2工程、及び第3工程を施し、得られた電気泳動のゲル上の分離分類されたcDNAの2つのパターンPa、Pbを比較する。Pa、Pbの同一種類に対応する位置にそれぞれcDNAのバンドx、yが存在すれば、x、yはA、Bに共通に含まれるmRNA由来のcDNAであることを意味し、Paのある位置にはcDNAのバンドzが存在するが、Pbの対応する位置にはcDNAのバンドが存在しないときは、zはAのみ含まれるmRNA由来のcDNAであることを意味する。したがって、zのみを電気泳動のゲルから回収することにより2つのmRNAの集合A、B間の引き算の集合A-B由来のcDNAを得る。

【0007】本発明においては、逆転写プライマーの標識として、ラジオアイソトープ、蛍光色素、ビオチンの少なくともいずれか1つ以上を用いることができる。

【0008】また逆転写プライマーとしてオリゴdTの3'末端にアデニン、グアニン、シトシンのいずれかで始まる、2〜4塩基長のデオキシヌクレオチドを結合した逆転写プライマーを使用する。

【0009】本発明で使用する逆転写プライマーの例には、図1に示す逆転写プライマー2、3、4があり、これは配列表の配列番号1で表されるものである。逆転写プライマー2、3、4はオリゴdTの3'末端にそれぞれ、グアニンG、アデニンA、シトシンCを付加したものである。配列表の配列番号2は、別の逆転写プライマーの例を示す。配列表の配列番号2に示す逆転写プライマーは、オリゴdTの3'末端にグアニンG、あるいはアデニンA、あるいはシトシンCで始まる2塩基長のオリゴヌクレオチドを付加したものである。この12種類の逆転写プライマーを用いれば、約1200〜2400のcDNAが分離分類できる。配列表の配列番号3は、別の逆転写プライマーの例を示す。配列表の配列番号3に示す逆転写プライマーは、オリゴdTの3'末端にグアニンG、あるいはアデニンA、あるいはシトシンCで始まる3塩基長のオリゴヌクレオチドを付加したものである。この48種類の逆転写プライマーを用いれば、約5000〜10000のcDNAが分離分類できる。配列表の配列番号4は、別の逆転写プライマーの例を示す。配列表の配列番号4に示す逆転写プライマーは、オリゴdTの3'末端にグアニンG、あるいはアデニンA、あるいはシトシンCで始まる4塩基長のオリゴヌク

4

レオチドを付加したものである。この192種類の逆転写プライマーを用いれば、約20000〜40000のcDNAが分離分類できる。配列表の配列番号1〜4に示した逆転写プライマーのオリゴdTの長さは、それぞれ7塩基、17塩基、17塩基、17塩基となっているが、これに限定されるものではない。7塩基〜30塩基のいずれの長さであっても同様に作用する。

【0010】

【実施例】以下 本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

【0011】実施例1

図1に本発明の一実施例を示す。図1において、1はmRNAの集合、2、3、4は逆転写プライマー、5は逆転写及び二本鎖cDNA作成工程、6、7、8は二本鎖cDNAの集合、9は制限酵素消化工程、10、11、12は制限酵素消化された二本鎖cDNAの集合、13は電気泳動のゲル、14、15、16は電気泳動のレーン、17は電気泳動工程、18は分離分類されたcDNAを意味する。mRNAの集合1は3'末端にポリA配列を有する一本鎖cDNAの集合であり、多量類含む。配列のそれぞれ異なる逆転写プライマー2、3、4を準備する。mRNAの集合1に逆転写プライマー2、3、4を各々独立にアニールし、逆転写酵素を用いた相補鎖DNAへの逆転写及びDNAポリメラーゼを用いた二本鎖cDNA作成工程5により、二本鎖cDNAの集合6、7、8を作成する。二本鎖cDNAの集合6は逆転写プライマー2を用いて作成したものでありポリAの1塩基前がシトシンCであるmRNAのサブ集合に対応する二本鎖cDNAの集合となっている。二本鎖cDNAの集合7は逆転写プライマー3を用いて作成したものであり、ポリAの1塩基前がチミンTであるmRNAのサブ集合に対応する二本鎖cDNAの集合となっている。二本鎖cDNAの集合8は逆転写プライマー4を用いて作成したものであり、ポリAの1塩基前がグアニンGであるmRNAのサブ集合に対応する二本鎖cDNAの集合となっている。互いに異なる配列を有する逆転写プライマー2、3、4に基づいて作成された二本鎖cDNAの集合6、7、8は当然互いに異なる。しかし、各々の二本鎖cDNAの集合6、7、8には多数種類のものが含まれている。すなわち、元の多量類存在するmRNAの集合1を、互いに同じものを含まない、3つの二本鎖cDNAの集合6、7、8のグループに分類したことになる。二本鎖cDNAの集合6、7、8に各々独立に、制限酵素消化工程9を施し消化された二本鎖cDNAの集合10、11、12を得る。制限酵素消化により1つの二本鎖cDNAは複数の二本鎖cDNAに分けられるが、以下、そのうち逆転写プライマーを含む配列、すなわち、最も3'末端側二本鎖cDNAのみを目する。二本鎖cDNAの種類によって、制限酵素の認識部位は異なるため、消化された二本鎖cDNAの集合10、1

特開平6-303997

(4)

6

1 12には長さによった分類分けが附加されたことになる。消化された二本鎖cDNAの集合10、11、12を電気泳動のゲル13の異なるレーン14、15、16にのせることにより、まず、逆転写プライマーの塩類によった分離を行う。次に、電気泳動工程17を施す。DNAの鎖長の短いDNA程、電気泳動で速く流れる性質によりDNAの鎖長によった分離を行う。電気泳動のゲル13上で、逆転写プライマーを含むcDNAのみを抽出することにより、分離分類されたcDNA18を得る。

【0012】なお、二本鎖cDNAのまま電気泳動する方法と、一本鎖cDNAに解離後電気泳動する方法の両方法とも本発明による分析法に適用可能である。第1工程5、第2工程9、及び第3工程17の標準的反応条件は、既知の条件。例えば、1989年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)発行、J. サムブルック、E. F. フリッチ及びT. マニアティス (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis) 共著、モレキュラー クローニング: ア ラボラトリー マニュアル セカンド エディション (Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition) を用いる。

【0013】上記逆転写プライマーとして、標識した逆転写プライマーを用いることにより、電気泳動のゲル13上で、逆転写プライマーを含むcDNAのみを容易に抽出できるようになる。標識の方法として、ラジオアイソトープ、蛍光色素、ビオチンが有効である。電気泳動のゲル13として、約50cmの長さのポリアクリルアミドゲルを用いると、1レーン当り100~2000のcDNAが分離できるため、図1の3種類の逆転写プライマー2、3、4を用いて、約300~600のcDNAが分離分類できる。

【0014】実施例2

図2はcDNAの集合間の引き算をする方法を示す。図2において符号19はmRNAの集合A、20はmRNAの集合Bである。21は逆転写のプライマーの集合の一要素の例である。また22、23は分離分類されたcDNAのパターン、24、25は一方の分離分類されたcDNAパターンには存在するが、他方の分離分類されたcDNAのパターンには存在しないcDNA、26はcDNAの回収工程、27、28は引き算結果であるcDNAの集合である。逆転写のプライマーの他の要素についても図2と同じ処理を行う。mRNAの集合19、20の各々に対して、同じ逆転写のプライマー21を用い、逆転写及び二本鎖cDNA作成工程5を施した後、制限酵素消化工程9により消化する。消化された二本鎖cDNAを電気泳動のゲル13の異なるレーン14、15にのせ、電気泳動工程17を施し、分離分類されたcDNAのパターン22、23を得る。22はmRNAの集合Aより得られたパターンであり、Paと呼ぶことと

する。23はmRNAの集合Bより得られたパターンであり、Pbと呼ぶこととする。Pa、Pb上の泳動距離が同一の2つのバンドには、同一種類のmRNA由来のcDNAが存在し、泳動距離が異なる2つのバンドには、異なる種類のmRNA由来のcDNAが存在する。したがって、24はPaに存在するが、Pbには存在しないcDNAであり、25はPbには存在するがPaには存在しないcDNAである。Paには存在するが、Pbには存在しないcDNAのみを独立に回収工程26により回収することにより、Paには存在するが、Pbには存在しないcDNAの集合27を得る。また、逆に、Pbには存在するが、Paには存在しないcDNAのみを独立に、回収工程26により回収することにより、Pbには存在するが、Paには存在しないcDNAの集合28を得ることができる。回収工程26として、電気泳動のゲル13より、cDNA24、25を切り出す方法が挙げられる。また、回収工程26として、電気泳動のゲル13より、cDNA24、25を電気泳動により、流出させて回収する方法が挙げられる。

【0015】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明によるcDNAの2次元分離分類法は、塩基配列の決定に先立って、cDNAの種類を分類し、2次元上の異なる位置に分離して配置することができるため次のような利点が生ずる。

(イ) 従来法で存在していた、同一種類のmRNA由来するcDNAの塩基配列を何回も求めてしまい、無駄な労力を費やしてしまうという問題が解決される。

(ロ) 従来法で存在していた、すべての種類のmRNAのうち、既にどれだけの物の塩基配列が求まり、どれだけの物が塩基配列を決定されずに残されているか不明であるため、どこで塩基配列決定作業を終了すればよいかの判断がつけられないという問題が解決される。

(ハ) mRNAの量は種類によって、数百~数千倍も異なっているため、従来法で存在していた、量の多いものから先に取り出され、量の少ないものは取りこぼしやすいという問題が解決される。

(ニ) 2つのcDNAの集合に含まれているcDNAの種類の差を容易に求めることができる。

本発明は、遺伝子発現の解析を容易、迅速かつ完全化する方法を提供するものであり、医学、生物学の分野に大きな貢献をする。

【0016】

【配列表】

【0017】配列番号: 1

配列の長さ: 8

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 逆転写プライマー

特開平6-303997

(5)

7

配列

5' TTTTTTTG 3'

5' TTTTTTTA 3'

5' TTTTTTTC 3'

【0018】配列番号: 2

配列の長さ: 各19

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 逆転写プライマー

配列

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCC 3'

【0019】配列番号: 3

配列の長さ: 各20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 逆転写プライマー

配列

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTC 3'

8

* 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCCG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGCA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGCT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGCC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAG 3'

10 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTATG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTATA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTATT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTATC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTACG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTACA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTACT 3'

20 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTACC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCAC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTG 3'

30 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCCG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCCA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCCT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTCCC 3'

【0020】配列番号: 4

配列の長さ: 各21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 逆転写プライマー

配列

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAT 3'

40

* 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGT 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGC 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAG 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAA 3'

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAT 3'

特開平6-303997

10

[illegible]

(7)

特開平6-303997

12

11

[illegible]

(8)

特開平6-303997

13

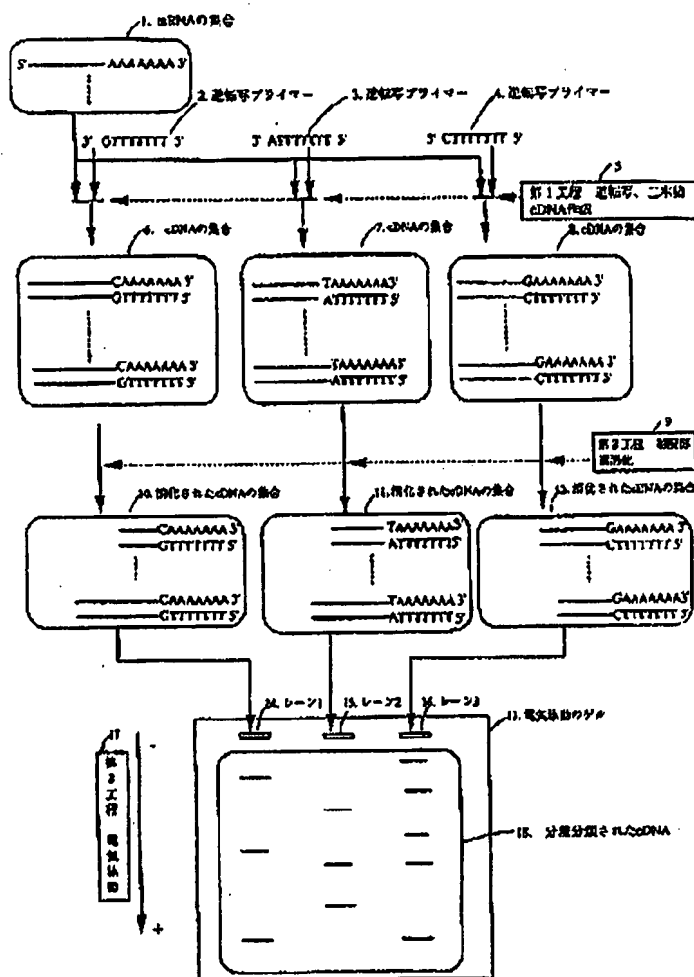
14

[illegible]

(10)

特開平6-303997

【図1】



(11)

特開平6-303997

【図2】

